

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Activation of mucosal associated invariant T cells in the lungs of sarcoidosis patients
別タイトル	Mucosal associated invariant T 細胞はサルコイドーシス患者の肺内で活性化している
作成者（著者）	大野(松山), 尚世
公開者	東邦大学
発行日	2020.03.15
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：中野裕康 / タイトル：Activation of mucosal associated invariant T cells in the lungs of sarcoidosis patients / 著者：Hisayo Matsuyama, Takuma Isshiki, Asako Chiba, Tetsuo Yamaguchi, Goh Murayama, Yoshikiyo Akasaka, Yoshinobu Eishi, Susumu Sakamoto, Sakae Homma, Sachiko Miyakea / 掲載誌：Scientific Reports / 巻号・発行年等：9(1):13181, 2019
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第936号
学位記番号	甲第641号
学位授与年月日	2020.03.15
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho.u.ac.jp/webopac/TD89907512

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

大野（松山）尚世より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 641 号

学位申請者： おお の まつやま ひさ よ
大 野 （松山） 尚 世

学位論文： Activation of mucosal-associated invariant T cells in the lungs of sarcoidosis patients

(Mucosal-associated invariant T 細胞はサルコイドーシス患者の肺内で活性化している)

著 者： Hisayo Matsuyama, Takuma Isshiki, Asako Chiba, Tetsuo Yamaguchi, Goh Murayama, Yoshikiyo Akasaka, Yoshinobu Eishi, Susumu Sakamoto, Sakae Homma, Sachiko Miyake

公表誌： Scientific Reports 9：13181, 2019

論文内容の要旨：

背景:サルコイドーシス(サ症)は全身性の肉芽腫性疾患である。病因は不明であるが、本邦では *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) が病因微生物の一つとされている。免疫学的には interferon (IFN) γ や肉芽腫形成に際し重要な働きをする tumor necrosis factor (TNF)- α 等の Th1 サイトカインの発現が亢進し Th1 型反応が優位とされる。自然免疫型 T 細胞の invariant natural killer T (iNKT) 細胞や Mucosal-associated invariant T (MAIT) 細胞は細菌成分を認識すると IFN- γ や TNF- α 等のサイトカインを迅速に多量に産生する。iNKT 細胞はサ症の病態形成に寄与する可能性が報告されているが、MAIT 細胞がサルコイドーシスの病態形成へ関与するのかわかではない。また、これまでに MAIT 細胞は様々な代謝性、感染性、自己免疫性疾患における病態形成との関与が報告されている。

目的:サ症において MAIT 細胞が果たす役割を明らかにする。

方法:サ症患者 40 人と健常コントロール (healthy control; HC) 群 28 人から得た末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) を分離し細胞表面染色を行い、フローサイトメトリー法を用いて MAIT 細胞の数及びその表面マーカーの発現を解析した。PBMC を *C. acnes* で刺激し、末梢血中 MAIT 細胞が *C. acnes* に対してどのように反応するのかわかを解析した。MAIT 細胞と関連するサイトカインを検証するため、血清中 IFN- γ 、TNF- α 、interleukin (IL) -18 値をサ症群及び HC 群で ELISA 法を用

いて測定した。病変局所における MAIT 細胞の動態を解析するため、サ症患者の気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 中の MAIT 細胞を末梢血と同様にフローサイトメトリー法で解析した。

結果: HC 群の PBMC を α CD28 と *C. acnes* で共培養したところ、MAIT 細胞上の activation marker である CD69 の発現が control と比較して上昇し、MAIT 細胞が *C. acnes* 刺激により活性化されることが示された ($P < 0.01$)。次にサ症群と HC 群の末梢血中の MAIT 細胞数を解析したところ、サ症群において末梢血リンパ球中に占める MAIT 細胞の割合は HC 群と比較して有意に低下しており ($2.5 \pm 0.40\%$ vs. $1.0 \pm 0.14\%$, $P = 0.0002$)、CD69 や programmed death (PD) -1 の発現は上昇していた。また、リンパ球中に占める MAIT 細胞の割合は MAIT 細胞上 PD-1 の発現と逆相関していた ($r = -0.446$, $P = 0.004$)。全身ステロイド投与の有無等の治療歴やレントゲン病期と MAIT 細胞上 CD69 発現との関連は認めなかったが、サ症の臨床的なマーカーである angiotensin-converting enzyme (ACE) 値や soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) 値と、MAIT 細胞上 CD69 の発現はいずれも正の相関がみられた (それぞれ $r = 0.46$, $P = 0.0005$, $r = 0.45$, $P = 0.007$)。血清中のサイトカインのうち血清 IL-18 値は HC 群と比較しサ症群で高く (122 ± 8 pg/mL vs. 247 ± 27 pg/mL, $P = 0.0001$)、MAIT 細胞上 CD69 の発現と IL-18 値は相関していた ($r = 0.43$, $P = 0.01$)。BALF の解析では BALF 中の MAIT 細胞上の CD69 発現は末梢血中と比較し有意に上昇していた ($P = 0.0001$)。また、肺野病変を有する症例群のリンパ球中の MAIT 細胞の割合及び MAIT 細胞の絶対数は、肺野病変を有さない症例群と比較して有意に高値であった ($0.74 \pm 0.17\%$ vs. $3.5 \pm 1.3\%$, $P = 0.03$)。

考察: MAIT 細胞は invariant な T 細胞受容体 α 鎖を発現する T 細胞であり、MR1 (MHC class I-like molecule) 分子に抗原提示される。抗原として広汎な細菌や真菌由来のリポフラビン代謝産物を認識し、ヒト末梢血や粘膜組織等に存在する。これまでにサ症の病因微生物として *Mycobacterium* 属や *Cutibacterium* 属が報告されている。以前の報告で MAIT 細胞は *Mycobacterium* 属を認識することが示されている。今回我々は *Cutibacterium* 属により MAIT 細胞が活性化されることを示した。MAIT 細胞が病因微生物とされる *Mycobacterium* 属及び *Cutibacterium* 属の両者により活性化しうることはサ症の病態形成への関与を裏付けるものと考えられる。

我々は末梢血中 MAIT 細胞が HC 群と比較してサ症群で減少していることを明らかにしたが、他の全身性炎症性疾患でも同様のことが報告されている。その機序としては主に 2 つの仮説がある。一つの仮説としては MAIT 細胞が末梢血中から炎症部位へ遊走するためとする説である。我々の検証でも MAIT 細胞を遊走・活性化させるサイトカインとされる血清 IL-18 値はサ症群で高値であり、かつ血清 IL-18 値と MAIT 細胞上の活性化マーカーの発現は相関していた。また、肺野病変を有する群において BALF 中の MAIT 細胞数が増加していることから、IL-18/IL-18R シグナルを介して末梢血から病変部局所へ MAIT 細胞の遊走が示唆された。もう一つの仮説は遷延する炎症の結果アポトーシス能が亢進するためとする説である。既報告では MAIT 細胞上の活性化カスパーゼ、T 細胞上の exhaustion marker である PD-1 の発現が亢進することが示されている。本研究においても MAIT 細胞上の CD69 及び PD-1 の発現は亢進しており、かつ PD-1 の発現と MAIT 細胞の割合は逆相関していたことから、全身性炎症が遷延した結果、MAIT 細胞が末梢血中で減少した可能性が示された。

結論: 末梢血中 MAIT 細胞は HC 群と比較しサ症群で減少かつ活性化し、MAIT 細胞はサ症群の肺病変部で強く活性化していたことから、MAIT 細胞はサ症の病態形成に関与しており、今後疾患の活動性の評価への臨床的な応用や、抑制性リガンドや抗体治療による将来的なサ症治療の標的となりうる。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 641 号	氏 名	大 野 (松山) 尚 世
学位審査担当者	主 査	中 野 裕 康
	副 査	海 老 原 覚
	副 査	松 瀬 厚 人
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	亀 田 秀 人

学位論文の審査結果の要旨 :

Mucosal-associated invariant T (MAIT) 細胞は invariant な T 細胞受容体 α 鎖を発現する自然免疫リンパ球の 1 種類であり、MR1 (MHC class I-like molecule) 分子に抗原提示される。また MAIT 細胞は、細菌由来のリボフラビン代謝産物を認識して活性化されることが知られている。一方でサルコイドーシスは原因不明の肉芽腫性疾患であるものの、その原因の一つとして抗酸菌感染や *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) 菌などの感染などが考えられていた。本研究ではサルコイドーシスにおける MAIT 細胞の役割について検討した。MAIT 細胞はサルコイドーシス患者の末梢血では CD69 などの活性化マーカーの発現が健常者と比較して亢進しており、かつ細胞数が減少していることが明らかとなった。一方で健常者由来の MAIT 細胞は *C. acnes* 菌により活性化され、細胞表面の CD69 の発現が上昇した。またサルコイドーシス患者由来の MAIT 細胞は、もともと活性化状態にあることから刺激によるさらなる活性化は認められなかったが、T 細胞の疲弊マーカーの一つである PD-1 の発現が健常者由来の MAIT 細胞に比較して増加しており、活性化された MAIT 細胞は疲弊している可能性が示唆された。肺病変を有するサルコイドーシス患者の気管支肺胞洗浄液中では MAIT 細胞数が、肺病変を有さない患者に比較して増加していた。また血清中の Interleukin (IL)-18, angiotensin-converting enzyme (ACE), soluble IL-2 receptor (sIL-2R) などの血清中における発現量と MAIT 細胞の活性化マーカーの発現の程度は相関していたことから、活性化された MAIT 細胞は IL-18 依存性に末梢血から病変局所である肺にリクルートしている可能性が示された。以上より MAIT 細胞の活性化は、サルコイドーシスの病態に密接に関連していることが明らかとなった。

2019 年 12 月 24 日に海老原、松瀬、近藤、亀田、中野の 5 名が出席して学位審査会が開催された。研究内容を発表した後で活発な質疑応答が行われた。審査委員からは①MAIT 細胞や *C. acnes* 菌が病巣のどこに存在するのか、②*C. acnes* 菌だけでなく、リボフラビンの代謝経路をもつ他の細菌も MAIT 細胞を活性化するのであれば、*C. acnes* 菌感染→MAIT 細胞活性化→サルコイドーシスの発症という一連の流れに特異性があるのか、③本論文で行なった様々な統計学的な解析手法に妥当性があるのか、④サルコイドーシスの病期と MAIT 細胞の末梢血での減少は相関するのか、⑤ステロイドなどの治療により MAIT 細胞の末梢血での減少や活性化は変化するのかなど様々な質問が提起された。それらに対して申請者は適切に回答した。MAIT 細胞がサルコイドーシス患者の末梢血で活性化して減少しており、肺局所で細胞数が増加しているということを示した今回の研究は、MAIT 細胞とサルコイドーシスの病態の関係を初めて示した研究であり、本論文は学位に値するとの結論に達し、学位審査会を終了した。